

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670752

研究課題名(和文) 異常癬痕のエピゲノタイプによる分類

研究課題名(英文) Epigenotyping of fibroproliferative scars

研究代表者

須永 中 (Sunaga, Ataru)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00406117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ケロイド由来線維芽細胞においてDNAメチル化による発現抑制を受けていると考えられる候補遺伝子を対象に、ヒストン脱アセチル化酵素処理による相乗的な遺伝子発現上昇が認められるかどうか解析し、180倍の効果を認めた遺伝子Xに注目した。正常皮膚由来線維芽細胞と比較してケロイド由来皮膚線維芽細胞において、Xの発現は減少していた。しかし、Methylation-specific PCRでは、Xのプロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化を確認することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)： We detected the genes unregulated synergistically by DNA demethylation and histone deacetylase inhibition in human keloid-derived fibroblasts, and focused on the gene X which was upregulated 180-fold. X was downregulated in keloid-derived fibroblasts compared with normal skin-derived fibroblasts. However, methylation-specific PCR could not confirm methylation of CpG island in the promoter region of X.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ケロイド エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) ケロイドは、主に創傷治癒の過程においておこる皮膚線維増殖性疾患である。なんらかの遺伝学的背景があると考えられてきたが、いまだに特定の原因遺伝子は見つかっていない。ケロイドはヒトにしかできず、ケロイドの病態を正確に反映したモデル動物が不在であるため、ケロイド検体を用いた研究しかできないことがケロイド研究の進展を妨げている。そのため、ケロイドの病態生理については徐々に理解がすすんできているものの、その病因や発生過程における有病者と健常人との違いについてはほとんどわかっていない。

(2) 遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island (CGが連続する配列) のDNAメチル化やヒストンの脱アセチル化などといった、エピジェネティック (epi-genetic: 遺伝の後に起こる) な修飾によっておきる遺伝子の発現抑制 (Epigenetic silencing) は、発生や発癌において大きな役割を果たしていることが知られている。例えば、発生の各段階において、もともと同じゲノムをもっているはずの細胞が、それぞれ異なる遺伝子を発現して様々な細胞に分化していく過程では、このエピジェネティックな遺伝子発現制御が主な役割を果たしていることが明らかになっている。また、多くの発癌の過程においては、癌抑制遺伝子の Epigenetic silencing が発癌の引き金になりうるということが知られている。

(3) 我々は、前年度までの研究において、ケロイド由来皮膚線維芽細胞初代培養株のコントロール群と脱メチル化酵素 (5-aza-dC) 処理群における遺伝子発現を DNA マイクロアレイによって網羅的に解析した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ケロイドの病因・病態にはエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与しているという仮説のもとに、ケロイドや肥厚性瘢痕といった線維増殖性瘢痕をエピゲノタイピングすることである。

3. 研究の方法

前年度までに施行したマイクロアレイデータの再解析より開始した。解析結果より、ケロイド由来皮膚線維芽細胞においてDNAメチル化によって遺伝子発現が silencing されている候補遺伝子を抽出した。

続いて、脱メチル化酵素に加えてヒストン脱アセチル化酵素阻害薬処理を行ったケロイド由来皮膚線維芽細胞における、候補遺伝子の発現解析を行い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬処理を加えることによって相乗的に発現が上昇する遺伝子を抽出した。

抽出された遺伝子について、正常皮膚由来線維芽細胞初代培養株とケロイド由来線維芽細胞初代培養株における発現を比較しした。さらに、ケロイド由来皮膚線維芽細胞より抽出したDNAを用いて、Methylation-specific PCRによる解析を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析結果

ケロイド由来皮膚線維芽細胞初代培養株3株のコントロール群と脱メチル化酵素 (5-aza-dC) 処理群において、脱メチル化酵素処理群で10倍以上発現が上昇している遺伝子は153種類存在した。それらの中で、プロモーター領域に CpG island を有し、かつX染色体上に存在しない遺伝子 (以下、候補遺伝子) は、36種類存在した。

(2)ヒストン脱アセチル化酵素処理後の遺伝子発現解析

ケロイド由来皮膚線維芽細胞に対して、脱メチル化酵素処理に加え、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(Trichostatin A)処理を行うことによる候補遺伝子群の発現変化を解析した。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬処理を加えることによって発現が相乗的に上昇した(脱メチル化酵素単独処理群と比較して2倍以上)遺伝子は8種類存在した。その中でも特に、脱メチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬処理によって、遺伝子発現量が脱メチル化酵素処理群と比較して180倍に上昇した遺伝子Xについて解析を進めた。

(3)遺伝子Xについての解析

遺伝子Xについて、正常皮膚由来線維芽細胞初代培養株とケロイド由来皮膚線維芽細胞初代培養株における発現量を解析したところ、ケロイド由来皮膚線維芽細胞において有意に発現が減少していた。ケロイド由来皮膚線維芽細胞において、遺伝子XのDNAメチル化による発現抑制が起きているものと考え、Methylation-specific PCR (MSP) を施行した。しかし、ケロイド由来皮膚線維芽細胞より抽出したDNAを用いた遺伝子XについてのMSP解析では、メチル化バンドと非メチル化バンドがともに観察された。これは、組織より初代培養した線維芽細胞がヘテロな集団であり、正常な線維芽細胞とケロイドの原因となる線維芽細胞(=遺伝子X発現抑制細胞?)が混在しているためと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、宮崎邦夫、桂木容子、加持秀明：ヒト化マウスを用いたケロイド動物モデルの開発、第22回日本形成外科学会総会基礎学術集会、2013/11、新潟

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、宮崎邦夫、桂木容子、加持秀明：ヒト化マウスを用いたケロイド動物モデルの開発、第43回日本創傷治癒学会、2013/11、大分

須永中、菅原康志、宇田宏一、去川俊二、桂木容子、宮崎邦夫、加持秀明
異常瘢痕の病理組織像についての再検討～不均一性についての考察
第57回日本形成外科学会総会・学術集会、2014/04/09、長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須永 中 (Sunaga ataru)

自治医科大学・形成外科・助教

研究者番号：00406117

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：